



TITLE:

Novel Soybean Enzymes Involved in the  
Oxidative Protein Folding in the  
Endoplasmic Reticulum( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Okuda, Aya

---

CITATION:

Okuda, Aya. Novel Soybean Enzymes Involved in the Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20431>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-03-22に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	奥田 綾
論文題目	Novel Soybean Enzymes Involved in the Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum (ダイズ小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディングに関わる新規酵素)		
(論文内容の要旨)			
<p>タンパク質の生産・貯蔵能力が高いダイズ種子は、栄養性・生理機能性などを付加した高品質化食料タンパク質、医療用および工業用タンパク質などの生産プラットフォームとしての利用が期待される。ダイズ種子に含まれるタンパク質の大部分は種子貯蔵タンパク質であり、粗面小胞体で生合成されジスルフィド結合形成を伴う酸化的フォールディングにより立体構造が形成されたものだけがタンパク質貯蔵液胞に輸送され蓄積する。したがって、有用タンパク質の生産のための基盤的知見として小胞体における酸化的フォールディングの分子機構の解明が必要である。本研究では、酸化的フォールディングに中心的な役割を果たすProtein Disulfide Isomerases (PDI) / ER Oxidoreductin 1 (ER01)系の一員である新規なPDIファミリータンパク質を同定し、それらの機能を明らかにした。また、ER01とは異なりPDIを介さずに単独でタンパク質にジスルフィド結合を導入する酵素であるQuiescin Sulfhydryl Oxidase (QSOX) を植物で初めて同定し、酸化的フォールディングにおける役割を検討した。</p> <p>第1章では、系統学的解析からPDIファミリーに属すると推定されたもののうち未同定であったclass VIおよびclass VIIのPDIファミリータンパク質をコードするcDNAをクローニングし、それぞれの遺伝子を<i>GmPDIL6</i>および<i>GmPDIL7</i>と命名した。コードされていた<i>GmPDIL6</i>は、活性中心CKHC配列を擁するチオレドキシンフォールドドメインを一つ持つ147アミノ酸残基のタンパク質であり、ウエスタンブロット分析によりダイズの子葉に14kDaのタンパク質として発現していることを明らかにした。<i>GmPDIL6</i> mRNAおよびタンパク質は、主要な種子貯蔵タンパク質の生合成が盛んな時期に高発現するとともに小胞体ストレスにより発現が誘導されることから、小胞体でタンパク質のフォールディングに関わっていることが示唆された。<i>GmPDIL7</i>は活性中心CGHCを擁するチオレドキシンフォールドドメインを一つ持ち、C末端近傍の膜貫通領域を介して小胞体膜に結合する433アミノ酸残基のタンパク質であることを明らかにした。<i>GmPDIL7</i>はダイズ組織に47kDaのタンパク質として普遍的に発現し、子葉では主要な種子貯蔵タンパク質の生合成が盛んな時期にmRNAおよびタンパク質が高発現することを見いだした。</p> <p>第2章では、cDNAを用いてリコンビナント<i>GmPDIL6</i>および<i>GmPDIL7</i>の大腸菌発現系を確立した。<i>GmPDIL6</i>および<i>GmPDIL7</i>は他の6種類のダイズPDIファミリータンパク質と同等のタンパク質ジチオール酸化活性を有するが、<i>GmPDIL6</i>は還元活性を持たず、<i>GmPDIL7</i>も相対的に低い還元活性を示した。さらに、レドックス緩衝液存在下での還元変性RNaseAの酸化的リフォールディング活性は<i>GmPDIL6</i>には検出されず、<i>GmPDIL7</i>も相対的に低かった。<i>GmPDIL6</i>および<i>GmPDIL7</i>の活性中心の酸化還元電位は高いリフォールディング活性を有する他のPDIファミリーの値とほぼ同じであることから、<i>GmPDIL6</i>と<i>GmPDIL7</i>の酸化的リフォールディング活性の低さは活性中心の酸化還元電位に起因するのではなく、分子全体の性質によるものであることを明らかにした。</p> <p>第3章では、<i>GmPDIL7</i>が、タンパク質の酸化的フォールディングにおいて補酵素FADの酸化力を使ってジスルフィド結合を供給するダイズER01 (<i>GmER01a</i>) の基質であり、<i>GmER01a</i>が存在する反応条件下で活性中心が酸化されることにより還元変性したRNase</p>			

Aを酸化的フォールディングする活性を示すことを明らかにした。しかし、その反応速度はGmER01aによる酸化速度に比して低く、GmPDIL7自身のフォールディング活性の低さが反応系全体の律速となっていることを明らかにした。また、GmPDIL7はGmPDIL-2と複合体を形成しているGmPDIMと直接会合していることを、ダイズ子葉抽出物の共免疫沈降で明らかにした。さらに、GmPDIL-2とGmPDIL7を共存させると相乗的な酸化的フォールディングの促進が見られることを見いだした。以上の結果から、GmPDIL7がGmER01から受け取ったジスルフィド結合を基質に導入し、続いてフォールディングが得意なGmPDIL-2がジスルフィド結合の架け替えを行う協調的な酸化的フォールディング機構の存在を提唱した。

第4章では、ER01と同様FADを補酵素とするオキシダーゼであるが、PDIを介さずにジスルフィド結合を直接タンパク質に導入する酵素QSOXのダイズオーソログ遺伝子2種類（*GmQSOX1*、*GmQSOX2*）をクローニングした。*GmQSOX1*のcDNAを用いてリコンビナントタンパク質の大腸菌発現系を確立し、リコンビナントGmQSOX1がFAD結合タンパク質であること、GmQSOXはジチオスレイトールを酸化するオキシダーゼであり、さらに変性タンパク質にジスルフィド結合を導入する活性を有するが、リフォールディング活性は有さないことを植物で初めて明らかにした。また、GmQSOXにはダイズPDIファミリータンパク質を酸化する活性がないことも確認した。しかし、*GmQSOX1*および*GmQSOX2*のmRNA量がダイズ種子貯蔵タンパク質の生合成が盛んにおこなわれている時期に増加すること、小胞体ストレスにより発現誘導されることから小胞体におけるタンパク質フォールディングと関係していることが示唆されたため、他のPDIファミリータンパク質と協同して酸化的フォールディングを行うとの作業仮説をたて、GmER01aによって酸化はされないが強いフォールディング活性を持つGmPDIL-2と協同的に作用していることを見いだした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

植物小胞体におけるタンパク質のジスルフィド結合を伴う立体構造形成（酸化的フォールディング）の分子機構は、植物種子を用いた有用タンパク質の生産系をデザインするための重要な基盤的知見であるが、生化学的な手法を用いて研究した報告はほとんどない。本研究では、主要作物の中で突出してタンパク質含量が高いダイズを研究対象として、新生タンパク質にジスルフィド結合を導入する新規なダイズのPDIファミリータンパク質を同定し、その酵素学的特性を検討した。また、新規PDIファミリータンパク質が*in vivo*で会合している他のPDIファミリータンパク質と、協同的に酸化的フォールディングを遂行する反応を解析した。さらに、動物で見いだされており生理的役割が不明であったQS0Xのダイズオーソログが、酸化的フォールディングにおいて果たす役割を追求した。評価される点は以下のとおりである。

1. 新規な植物PDIファミリー*GmPDIL6*と*GmPDIL7*を同定し、これらが小胞体ストレス応答遺伝子であること、および*GmPDIL6*と*GmPDIL7*のmRNAsおよび翻訳産物が種子の子葉で貯蔵タンパク質の生合成が盛んな時期に増加することから、種子貯蔵タンパク質のフォールディングに重要な役割を果たしていること示唆した。
2. 真核生物で初めて、膜結合性PDIファミリータンパク質（*GmPDIL7*）が*GmER01*の基質となることを見いだした。
3. *GmPDIL7*が生体内で他の複数のPDIファミリータンパク質と会合しており、これらが協同的に作用することで、より効率的に酸化的フォールディング反応が進行することを明らかにした。
4. 植物のQS0Xオーソログの酵素学的特性を初めて明らかにし、フォールディング活性が高いPDIファミリータンパク質との共存により、*GmER01a*による酸化当量の供給を受けることなく速やかにタンパク質をフォールディングすることを明らかにした。

以上のように、本論文は、植物小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディングにおいて基質タンパク質へジスルフィド結合を導入する重要なタンパク質を発見し、またその作用の分子機構の一端を明らかにしている。これらの結果は、ダイズ種子を用いた有用タンパク質の生産系を構築するための重要な基礎的知見を与えるものであり、品質設計開発学、植物生化学、酵素化学、構造生物学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：        年        月        日以降（学位授与日から3ヶ月以内）